

法政大学学術機関リポジトリ
HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

2種イオン駆動型べん毛モーターの入力と出力の関係

著者	荒居 謙太
出版者	法政大学大学院理工学・工学研究科
雑誌名	法政大学大学院紀要．理工学・工学研究科編
巻	58
発行年	2017-03-31
URL	http://hdl.handle.net/10114/13728

2 種イオン駆動型べん毛モーターの入力と出力の関係

INPUT-OUTPUT RELATIONSHIP OF DUAL ION DRIVEN FLAGELLAR MOTOR

荒居謙太

Kenta ARAI

指導教員 曾和義幸

法政大学理工学研究科生命機能学専攻修士課程

The bacterial flagellar motor converts the free energy that gained from the ion flux across the cytoplasmic membrane to the rotational torque. The motor consists of a rotor surrounded by multiple ion-conducting stator units. Coupling ions are known to be H^+ , Na^+ or K^+ , depending on bacterial species. *Bacillus alcalophilus* uses Na^+ and K^+ conducting MotPMotS as a stator. Interestingly, the motor of *Escherichia coli* cells expressing BA-MotPS is driven by both Na^+ and K^+ , although the motor in *E. coli* is driven by H^+ in nature. In this study, we measured both ion-motive force and motor torque of MotPMotS motor in *E. coli*. The torque increased linearly with increasing the sodium- and potassium ion-motive force. The linear slope is similar to the original *E. coli* H^+ -driven motor, indicating that the bacterial flagellar motor running on any type of ion-motive force generates torque at the constant efficiency.

Key Words : flagellar motor, coupling ion, ion-motive force, torque-speed

1. 緒言

バクテリアべん毛モーターは、超高速回転、高効率エネルギー変換機構、高速スイッチング機構を特徴とするナノマシンである。モーターの基本構造は、回転子と複数個の固定子ユニットからなる。固定子ユニットはイオンチャネルとしても機能し、共役イオンが通過することによって得られるエネルギーを回転トルクに変換している。モーターは、イオン流によって得られるエネルギーをほぼ 100% の効率で出力に変換すると考えられているが、その詳細は明らかにされていない。1 個のイオンあたりのエネルギーはイオン駆動力 (Ion-motive force) とよばれ、膜電位および細胞内外のイオン濃度の比から計算することが出来る (1)。エネルギー変換機構を解明する上で、制御されたイオン駆動力に対する出力を計測することは必須である。しかし、従来のべん毛モーター研究で用いられてきた大腸菌やサルモネラ菌は、 H^+ 共役型の固定子 MotAMotB を持つため、入力制御が困難であった。一方で、べん毛モーターの一分子計測法は確立されており、モーターの回転速度やトルクを容易に測定する事が出来る。そこで、*Bacillus alcalophilus* の固定子 MotPMotS を用いることにした。この固定子は Na^+ 、 K^+ と共役することができ、細胞外液のイオン濃度を変化させるだけでイオン駆動力の制御ができると考えた。さらに、固定子 MotPMotS は大腸菌べん毛モーターの回転子と相互作用できるので、一分子レベルの出力解析を行う事が出来る [1]。本研究では、

バクテリアべん毛モーターのエネルギー変換機構の解明のため、2 種類のイオンで駆動する大腸菌べん毛モーターの入力と出力の関係を明らかにすることにした (図 1)。そこで、 Na^+ 駆動力、 K^+ 駆動力を独立に定量し、モーター出力の計測を行った。

$$\text{Ion-motive force (mV)} = \Delta V + \frac{k_B T}{e} \cdot \ln \frac{[\text{ion}]_{\text{in}}}{[\text{ion}]_{\text{out}}} \quad (1)$$

ΔV : 膜電位, k_B : ボルツマン定数,

T : 絶対温度, e : 電気素量

$[\text{ion}]_{\text{in}}$: 細胞内イオン濃度, $[\text{ion}]_{\text{out}}$: 細胞外イオン濃度

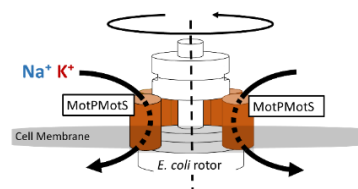


図 1 大腸菌 MotPMotS モーター

2. 実験方法

本研究では、MotPMotS 発現プラスミドを移入した大腸菌 $\Delta\text{motA}\Delta\text{motB}$ 株について細胞外液のイオン濃度を変化させた条件下で、モーター出力の定量をおこなった。様々な細胞外液のイオン濃度条件下における細胞内イオン濃度と膜電位を測定し、イオン駆動力を見積もった。膜電位

は、膜透過性の高い蛍光試薬 Tetramethylrhodamine, methyl ester (TMRM) を用い、全反射蛍光顕微鏡で画像化した細胞内外の蛍光強度比から算出した。細胞内イオン濃度は、強酸で細胞膜を破碎した細胞液を原子吸光光度計で測定した。モーター出力は、べん毛フィラメントにビーズを付着させ、ビーズの重心位置を高時空間分解能で追跡するビーズアッセイを用いた。

3. 結果と考察

本研究では、細胞外液に含まれる Na^+ , K^+ 濃度をそれぞれ 3-85 mM と変化させて、各条件下におけるイオン駆動力を定量したのち、モーター出力を測定した。

まず、細胞内イオン濃度については、細胞外液に依存して、細胞内の Na^+ , K^+ 濃度が大きく変化した (図 2A)。膜電位の測定では、TMRM の細胞壁の透過性を向上させるために、EDTA で細胞を処理した。この時、EDTA によってモーター機能が低下しない条件を検討した。膜電位は、細胞外の Na^+ , K^+ 濃度を変化させても常に一定の値を示した (図 2B)。この測定結果は、膜電位は pH 変化にて依存し、イオン濃度には依存しないと報告する過去の論文[2]と一致する。

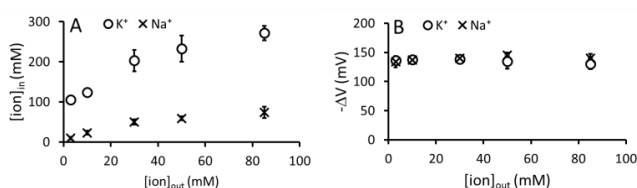


図 2 細胞外液条件によるイオン駆動力の計測
(A) 細胞内イオン濃度 (B) 膜電位

つぎに、ビーズアッセイによってモーター回転速度の計測をおこなった。フィラメントに付着した直径 $1 \mu\text{m}$ のビーズの重心位置は高速度カメラで検出し、その位置情報を周波数解析することで、モーター回転速度を計測した。なお、この計測条件は比較的負荷が高く、モーターは低速回転をする。モーターの回転速度は、急激に変化する様子をみることも出来た (図 3 inset)。この速度のゆらぎは、モーターに組み込まれている固定子ユニットの数が増えることによって起こる。固定子の組み込み効率の変化は、モーターにかかる負荷、イオン駆動力によって変動することが報告されている。本研究で使用したモーターは、同じ条件下においても、速度のゆらぎが頻繁におこり、その頻度もモーターの個体差がみられた。

本解析ではモーター間の差をなくすため、モーターに組み込まれている固定子の数が 1 個の時のモーター回転速度を見積もる事にした。固定子 1 個が生み出すモーター回転速度の見積もりは、急激な速度変化の 1 ステップからおこなった。固定子 1 個が生み出すモーター回転速度は、 Na^+ , K^+ 濃度に依存していた (図 3)。

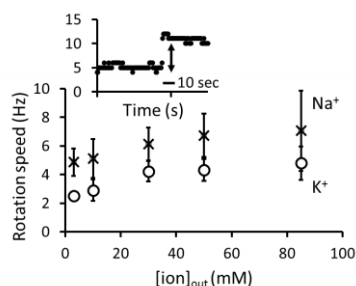


図 3 細胞外液イオン濃度とモーター回転速度
(inset) 固定子 1 個が生み出すモーター回転速度の推定

イオン駆動力とモーター出力をまとめたものが図 4 である。まず、細胞外液に含まれるイオン濃度を変化させることで、 $-50 \text{ mV} \sim -150 \text{ mV}$ という幅広い範囲のイオン駆動力を計測する事ができた。イオン駆動力とモーター回転速度の関係は、 Na^+ 駆動力と Na^+ 駆動時のモーター回転速度、 K^+ 駆動力と K^+ 駆動時のモーター回転速度は共に比例関係にあり、原点を通るように近似した直線の傾きはほぼ同じであることがわかった。つまり、 K^+ 駆動力と Na^+ 駆動力のモーター出力への変換率は同程度であると考えられる。また、 H^+ 駆動力と出力の関係が報告された研究結果[3]とこの直線の傾きはほぼ一致している。つまり、べん毛モーターのイオン駆動力からモーター出力への変換効率は、イオン透過が律速とならない条件下において、共役イオン種による差はないと考えられる。

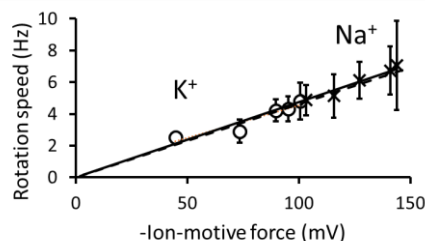


図 4 モーターの入力と出力の関係
実線: Na^+ 駆動力と Na^+ 駆動時のモーター回転速度の近似直線、点線: K^+ 駆動力と K^+ 駆動時のモーター回転速度の近似直線

4. 結言

以上の結果より、べん毛モーターはイオン流から得られる入力エネルギーをモーター回転速度へと変換する機構は、あらゆる共役イオンに共通すると期待できる。今後は、より高速で回転する条件においても、入出力関係を求めることで、モーターエネルギー変換機構の解明に迫りたい。

参考文献

- 1) Terahara, N. et al. (2012) *PLoS One*. 7(9): e46248
- 2) Lo, C.J. et al. (2007) *Biophys J*. 93(1): 294-302
- 3) Gabel, C.V. et al. (2003) *PNAS*. 100 (15): 8748-5